



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Especialidade de Biologia Molecular em Medicina
Tropical e Internacional

A relevância do factor de transcrição Yap5
de *Saccharomyces cerevisiae* na
resposta ao excesso de ferro

Cristina Maria Teixeira Vicente

2010



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



**A relevância do factor de transcrição Yap5
de *Saccharomyces cerevisiae* na
resposta ao excesso de ferro**

Cristina Maria Teixeira Vicente

*Tese apresentada para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia
Molecular em Medicina Tropical e Internacional.*

Orientador:

Prof^a Doutora Claudina Rodrigues-Pousada

2010

O trabalho descrito nesta tese foi elaborado no

Laboratório de Genómica e Stress,

Instituto de Tecnologia Química e Biológica,

Universidade Nova de Lisboa

*“What is a scientist after all? It is a curious man looking through a keyhole,
the keyhole of nature, trying to know what’s going on.”*

Jacques-Yves Cousteau

Agradecimentos

À Professora Doutora Claudina Rodrigues-Pousada por todo o rigor e conhecimento científico demonstrado no decorrer deste estudo, pela orientação e amizade.

À Catarina Pimentel por todo o empenho, pela amizade e pela ajuda imprescindível na elaboração da presente tese.

A todos os meus colegas de laboratório pelo companheirismo e bons momentos ao longo de todo o processo e pela ajuda pontualmente necessária durante o trabalho experimental.

À Carolina pela força e apoio incondicional.

E à minha família, que mesmo longe, sempre me apoiou.

Palavras-chave

Saccharomyces cerevisiae; resposta ao stress; ferro; homeostase; Yap5; *CCCI*

Resumo

A capacidade que os organismos possuem de alterar os seus padrões de expressão de genes em resposta a alterações no meio ambiente é essencial para a sua viabilidade. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em particular, possui um programa complexo e muito flexível de expressão de genes quando exposta a mudanças agressivas do seu meio ambiente. As células mantêm a sua homeostase através de mecanismos coordenados de regulação de vários factores de transcrição, cada um desempenhando funções específicas.

Neste trabalho foi estudada a relevância do factor de transcrição da família Yap de *S. cerevisiae*, o Yap5, na destoxificação do excesso de ferro na célula.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que após a incubação com elevadas quantidades de sulfato de ferro, embora o potencial de transactivação do Yap5 aumente, os níveis da proteína diminuem, sendo esta diminuição dependente da concentração de ferro.

Demonstrámos também que embora a expressão do gene *CCCI* (que codifica para o único transportador vacuolar de ferro conhecido) seja dependente do Yap5 em condições de excesso de ferro, os níveis basais de expressão deste gene são suficientes para a sobrevivência nessas condições.

Observámos ainda que, ao contrário do que acontece em *Schizosaccharomyces pombe*, o factor de transcrição Hap4, não parece estar envolvido nesta regulação. Através de deleções sequenciais da região promotora do *CCCI*, verificámos que os níveis de expressão ditados por uma região de 58pb a montante do codão de iniciação, ATG, são suficientes para a célula sobreviver sob concentrações elevadas de ferro. Verificámos ainda que a região 3'UTR do gene é importante para a

sobrevivência celular. Nessa região, identificámos uma estrutura em forma de “hairpin” que poderá estar envolvida na regulação do gene.

Keywords

Saccharomyces cerevisiae; stress response; iron; homeostasis; Yap5; *CCCI*

Abstract

The ability of the organisms to alter their gene expression patterns in response to environmental changes is essential for viability. In particular, *Saccharomyces cerevisiae* possesses a very flexible and complex programme of gene expression when exposed to a plethora of environmental insults. Cells maintain their homeostasis through a highly coordinated mechanism of transcription regulation involving several factors, each performing specific functions.

In this work, using several *S. cerevisiae* mutant strains, we studied the influence of the Yap family member, Yap5 in iron detoxification under iron overload conditions.

The results obtained in this work show that after incubation with high iron concentrations, although the transactivation potential of Yap5 increases, the protein levels decrease in a way that is dependent on the intensity of the stress.

We demonstrated that the expression of the *CCCI* gene (that encodes for the only known iron vacuolar transporter) is not fully dependent on Yap5 since basal expression levels of this gene are enough to overcome iron toxicity.

We showed that in contrast to what happens in *Schizosaccharomyces pombe*, the Hap4 transcription factor is not regulating *CCCI* expression. Through sequential deletions of *CCCI* promoter region we delimited a region of 58bp upstream the initiation codon, ATG, which is enough to endow cells with the ability to grow under iron overload conditions. Within this region, we identified a hairpin structure, which is localized immediately after the stop codon, and that might be important in *CCCI* gene regulation.

Lista de Abreviaturas e Unidades

°C	Graus Celsius
A	Adenina
AP-1	Proteína Activadora 1
BSA	Albumina de Soro Bovino
bZIP	Domínio Básico de Ligação ao DNA
C	Citosina
dATP	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina-5'trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
OD _{600nm}	Densidade Óptica a 600 nanómetros
dTTP	2'-desoxitimidina-5'-trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminatetracético
FeSO ₄	Sulfato de Ferro
FP	“full promoter”
G	Guanina
Grx	Glutarredoxina
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Hsp	“Heat Shock Protein”
LB	Luria-Bertani
M	Molar (mol/L)
mM	Mili Molar
MOPS	“3-(N-morpholino)propanesulfonic acid”
mRNA	RNA mensageiro
MSC	Meio Sintético Completo

Msn	Supressor Multicópia de <i>snf1</i>
m/v	Massa por Volume
pb	Pares de Bases
PCR	Reacção em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por Minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SP	“small promoter”
STRE	Elemento de resposta ao Stress
T	Timina
TE	Tris-EDTA
Trx	Tiorredoxina
UTR	“Untranslated region”
V	Volt
v/v	Volume por Volume
Yap	Proteína Activadora de Levedura
<i>YAP</i>	Gene yap
<i>yap</i>	Mutante yap
Δ yap	Mutante yap
Ycf1	Factor de Cádmio na Levedura
YPD	Glucose-Peptona-Extracto de Levedura
μ l	Microlitro

Índice

Agradecimentos.....	6
Resumo.....	7
Abstract.....	9
Lista de Abreviaturas e Unidades.....	10
Índice de Figuras.....	14
Índice de Tabelas.....	15
Capítulo I. Introdução	16
I.1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - um modelo eucariota no estudo da resposta ao stress.....	17
I.2 Factores de transcrição envolvidos na resposta ao stress	18
I.2.3 A família Yap (“Yeast Activator Protein”)	19
I.2.3.1 – O Yap 5 na resposta ao excesso de ferro – estado da arte	21
Objectivos	25
Capítulo II. Materiais e Métodos.....	26
II.1 - Estirpes, condições de crescimento e análises de sensibilidade.....	27
II.2 – Manipulação de DNA e plasmídeos.....	28
II.3 – Preparação de células competentes de levedura.....	30
II.4 – Transformação de levedura.....	30
II.5 - Preparação de amostras de RNA e análise por Northern Blot	31
II.6 - Medição da actividade da β -Galactosidase	32
II.7 – Purificação e análise de proteínas por Western Blot	32
Capítulo III. Resultados e Discussão	35
III.1 – A expressão do Yap5 diminui na presença de elevadas concentrações de ferro.....	36

III.2 – O crescimento do mutante <i>yap5</i> é apenas ligeiramente afectado na presença de elevadas concentrações de ferro.	39
III.3 – Os níveis basais de <i>CCC1</i> , não dependentes do Yap5, são suficientes para o crescimento em altas concentrações de ferro.	40
III.4 – Análise funcional da região promotora do gene <i>CCC1</i>	42
III.5 – Importância da região 3'UTR na regulação da expressão do gene <i>CCC1</i>	46
Capítulo IV. Conclusões e Perspectivas	49
Referências Bibliográficas	52

Índice de Figuras

Capítulo I

Figura I-1 Ligação ao DNA do factor de transcrição Gcn4.....	19
Figura I-2 Comparação da sequência dos domínios bZIP dos oito membros YAP de <i>S. cerevisiae</i> com as regiões correspondentes do Gcn4 e ortólogos em <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Pap1) e <i>Candida albicans</i> (Cap1) (Fernandes <i>et al.</i> , 1997).	20
Figura I-3 Relação filogenética entre os diferentes membros da família Yap e sequências nucleotídicas dos seus domínios de ligação ao DNA (Tan <i>et al.</i> , 2008).....	21
Figura I-4 Modelo de regulação do gene <i>CCCI</i> pelo Yap5 na presença de ferro (adaptado de (Li <i>et al.</i> , 2008)).....	25

Capítulo III

Figura III-1 Expressão do Yap5 em células da estirpe <i>yap5</i> transformadas com a construção Yap5_HA quando expostas a 2mM de sulfato de ferro durante 30 e 60 minutos.	36
Figura III-2 Expressão de Yap5 em células da estirpe <i>yap5</i> transformadas com a construção Yap5_HA quando expostas a 2mM de sulfato de ferro durante os tempos indicados.....	37
Figura III-3 Expressão de Yap5 em células da estirpe <i>yap5</i> transformadas com a construção Yap5_HA quando expostas a 5mM de sulfato de ferro durante os tempos indicados.....	37
Figura III-4 Potencial de transactivação do Yap5 na presença de ferro	38
Figura III-5 Crescimento das estirpes mutantes e selvagem (By4742) durante 48h ou 24h (*) em meio sintético completo sólido suplementado com 1mM, 6mM e 15mM de sulfato de ferro.	39
Figura III-6 Expressão do gene <i>CCCI</i> em células da estirpe selvagem e <i>yap5</i> quando expostas a diferentes concentrações crescentes de sulfato de ferro durante 20 minutos (A). A indução do <i>CCCI</i> em condições de presença de ferro é dependente do Yap5. Células “wild type” e mutantes <i>yap5</i> foram induzidas com 2mM FeSO ₄ , recolhidas nos tempos indicados e analisou-se a expressão génica por Northern blot (B).....	40
Figura III-7 O duplo mutante <i>yap5ccc1</i> e o mutante <i>ccc1</i> exibem o mesmo fenótipo de crescimento quando as células são induzidas na presença de ferro.	41
Figura III-8 Representação esquemática das construções <i>CCCI_FP</i> (do inglês “full promoter”) e <i>CCCI_SP</i> utilizadas para transformar a estirpe <i>ccc1</i> (A). A sensibilidade do mutante <i>ccc1</i> é suprimida pela complementação com a construção que consiste no gene <i>CCCI</i> sob o controlo de uma versão truncada da sua promotora, sem os YREs (<i>CCCI_SP</i>). A estirpe <i>ccc1</i> reconstituída com a versão nativa da promotora do <i>CCCI</i> , <i>ccc1<CCCI_FP></i> , não difere, em termos de crescimento em	

condições de excesso de ferro, da estirpe *ccc1<CCCI_SP>*. O crescimento das estirpes indicadas em meio selectivo sólido suplementado com 6mM de sulfato de ferro foi monitorizado durante 48h a 30°C (B)..... 41

Figura III-9 Representação esquemática da construção *CCCI_sp_HapM* utilizada para transformar células *ccc1* (A). A sensibilidade do mutante *ccc1* é suprimida pela complementação com a construção que consiste no gene *CCCI* sob o controlo de uma versão truncada da sua promotora, sem a sequência consensus do Hap (*CCCI_sp_HapM*). A estirpe *ccc1* reconstituída com a versão truncada da promotora do *CCCI*, *ccc1<CCCI_SP>*, não difere, em termos de crescimento em condições de excesso de ferro, da estirpe *ccc1<CCCI_sp_HapM>*, sendo a nomenclatura *CCCI_sp_HapM#1* e *CCCI_sp_HapM#2* referentes a duas transformações independentes da mesma construção. O crescimento das estirpes indicadas em meio selectivo sólido suplementado com 6mM de sulfato de ferro foi monitorizado durante 48h a 30°C (B). 44

Figura III-10 Para confirmar que o Hap4 não está de facto a regular a expressão do *CCCI*, o mutante *hap4* e o duplo mutante *yap5hap4* foram construídos e o seu crescimento monitorizado em meio selectivo sólido suplementado com 6mM de sulfato de ferro durante 48h a 30°C. 44

Figura III-11 Representação esquemática das construções contendo deleções sequenciais da região promotora do *CCCI*. 45

Figura III-12 A estirpe *ccc1* foi transformada com as diversas construções descritas (figura III-11) e o seu crescimento monitorizado em meio sólido selectivo suplementado com sulfato de ferro durante 24h a 30°C. 45

Figura III-13 Representação esquemática das construções *CCCI_SP* e *CCCI_sp_stop* (A). A estirpe mutante *ccc1* foi transformada com ambas as construções e o seu crescimento monitorizado durante 48h a 30°C em meio sólido suplementado com as concentrações de sulfato de ferro indicadas. Podemos verificar um comprometimento ligeiro do crescimento das células transformadas com a construção *CCCI_sp_stop* para altas concentrações de ferro (B). 46

Figura III-14 Estrutura “hairpin” presente a montante do codão STOP do gene *CCCI*.(Zuker, 2003; Reeder *et al.*, 2006). 48

Índice de Tabelas

Capítulo II

Tabela II-1 Estirpes de *S.cerevisiae* utilizadas..... 34

Tabela II-2 Primers utilizados neste trabalho 34

Capítulo III

Tabela III-1 Potenciais factores de transcrição do gene *CCCI*. (*) a partir do ATG 42

Capítulo I

Introdução

I.1 - *Saccharomyces cerevisiae* - um modelo eucariota no estudo da resposta ao stress

Na Natureza, os organismos são continuamente submetidos a vários stresses, isto é, rápidas e bruscas variações no meio ambiente que podem alterar as suas funções celulares e até mesmo impedir o seu crescimento. A manutenção de um estado de equilíbrio, homeostase, tornou-se então um desafio constante e mandatório de forma a garantir a sobrevivência dos organismos quando expostos a diversos stresses. São exemplos de stress as mudanças de temperatura, de osmolaridade, exposição a compostos tóxicos, carência de nutrientes, irradiação, dissecação, entre outros (Gasch and Werner-Washburne, 2002).

O estudo das respostas aos diferentes stresses é crucial para a compreensão do modo como os organismos uni e multicelulares se adaptam às referidas alterações. Estas respostas requerem um complexo sistema de reconhecimento e transdução de sinal que resultam no aumento da expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta ao stress em questão, as chaperones moleculares (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2005).

Estas proteínas, de variadas massas moleculares, conferem à célula mecanismos de protecção tais como a degradação de proteínas mal formadas que apresentam propriedades tóxicas. Simultaneamente, a síntese proteica constitutiva é reprimida através de vários mecanismos, particularmente ao nível da iniciação desta síntese e/ou ao nível da estabilidade dos mRNAs. A existência destes mecanismos moleculares de resposta ao stress, muitos dos quais altamente conservados ao longo da natureza, fornecem à célula a flexibilidade necessária para se adaptar às diversas variações do meio ambiente que a rodeia.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, vulgarmente conhecida por “fermento de padreiro” (“baker yeast”) é considerada um organismo modelo no estudo dos mecanismos de resposta ao stress. Apesar de ser um organismo unicelular, como eucariota apresenta uma organização intracelular complexa e consequentemente mecanismos complexos de regulação da expressão genética tal como nos organismos multicelulares. A utilização de leveduras como modelo

experimental apresenta inúmeras vantagens - a *S. cerevisiae* é de fácil manipulação genética, tem um tempo de geração curto e o seu genoma está completamente sequenciado, o que permite uma identificação rápida dos genes envolvidos na resposta ao stress, bem como a compreensão de determinados mecanismos moleculares utilizados pelos mamíferos na regulação de diversos tipos de stress, tais como o stress oxidativo, que pode estar associado a doenças neurodegenerativas, má circulação sanguínea, cancro, anemia, desenvolvimento anormal dos ossos e do sistema nervoso bem como respostas imunes deficientes.

De facto, *S. cerevisiae* contém quase duzentos genes ortólogos aos que causam doença em organismos eucariotas superiores. Exemplo disto é o gene *YCF1*, que confere resistência ao cádmio, e cuja sequência apresenta grande homologia com a dos membros da superfamília de transportadores ATP em humanos, Mrp1 e Cftr1, ambos envolvidos na doença fibrose cística (Li *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997). Outro exemplo são os genes *PAT1* e *PAT2*, que codificam para as subunidades de um transportador peroxisomal, necessário para a importação de ácidos gordos de cadeia longa para o peroxisoma. Estes genes são ortólogos do gene *ALD* em humanos que quando mutado está associado à doença neurodegenerativa peroxisomal que afecta o cromossoma X - a adrenoleucodistrofia (ALD) (Hettema *et al.*, 1996). Também têm revelado ser um excelente modelo para estudar certos tipos de doenças neurodegenerativas (Khurana and Lindquist, 2010).

I.2 Factores de transcrição envolvidos na resposta ao stress

Embora sejam conhecidos o Hsp1 e o Msn2 e Msn4 como factores de transcrição envolvidos na resposta ao stress, neste trabalho apenas nos concentrámos na família Yap.

I.2.3 A família Yap (“Yeast Activator Protein”)

Todos os organismos eucariotas desde as leveduras até aos humanos contêm factores de transcrição AP-1 que regulam a expressão de classes específicas de genes em resposta a uma grande variedade de estímulos extracelulares. Por definição, as proteínas AP-1 contêm um domínio bZIP de ligação ao DNA. Este domínio bZIP (“Basic region leucine zipper”) consiste numa estrutura formada por duas hélices α contendo leucinas de ambos os lados ao longo de cada uma das hélices e que está envolvida na dimerização e formação de uma interface simétrica de ligação a sequências alvo da dupla cadeia de DNA denominadas “AP-1 sites” (TGACTCA) (Fig.I-1) (Coleman *et al.*, 1997; Fernandes *et al.*, 1997; Toone and Jones, 1999).

Na levedura *S. cerevisiae* o factor de transcrição AP-1 melhor caracterizado é o Gcn4, que activa coordenadamente a transcrição de pelo menos 40 genes em resposta a carência de aminoácidos e outras circunstâncias ambientais.

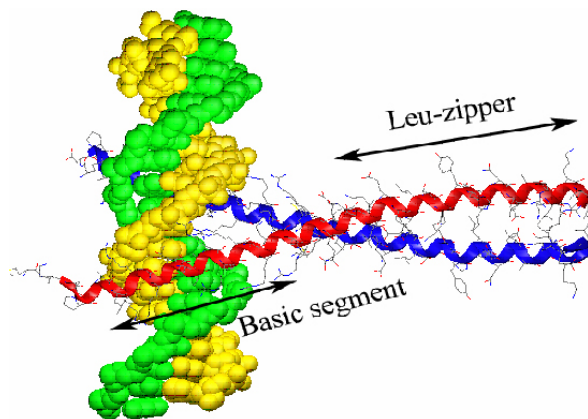


Figura I-1 Ligação ao DNA do factor de transcrição Gcn4
(<http://www.bio.jhu.edu/Faculty/Privalov/Default.html>)

Gcn4, Met28, Acr1/Sko1 e Hac1 são alguns dos 14 factores de transcrição bZIP identificados em *S. cerevisiae*, dos quais, oito pertencem a família Yap (Yap1 - Yap8) (Fernandes *et al.*, 1997).

Basic region	Leucine zipper	
QKRTAQNRAAQRA F FRERKERK M KELEKKVQSLESIOQQNEVEATFLRDQ L ITL		Yap1 (68-120)
SRRTAQNRAAQRA F FRDRKEAK M KS L QERVELLEQKDAQNKT T TD F LLCS L KSL		Yap2 (47-99)
AKKKAQNRAAQK A FRERKEARMKE L QDK L LESERNRQSL L KEIEELRKANT E I		Yap3 (148-200)
TKRAAQNRSAQK A FRQRREKY I KNLEEK S KL F DGL M KENSE L K M IES L KS L		Yap4 (241-293)
QKKKRQNRDAQRA Y FRERKNNKLQVLEET I ESLSKV V KNY E TK L NRLQNE L QAK		Yap5 (62-114)
TRRAAQNR T AQK A FRQRKEKY I KNLEQK S K I FDD L LAEN N N F KSLNDS L RND N		Yap6 (225-277)
EKRRRQNRDAQRA Y FRERR T TR I QVLEEK V E M LHNL V DDWQ R KY K LL E SE F SD T		Yap7 (129-181)
NKRAAQLRASQNA F FRKRKLER L EELEKKEAQLTV T NDQ I H L L K ENEL L H F ML		Yap8 (20-72)
SKRTAQNRAAQRA Y FRERKERK M KELEDK V RLLEDANVR A LT E TD F LRAQ V D V L		Cap1 (44-96)
SKRKAQNRAAQRA F FRKRKEDHLKA E TQV T LKELH S ST T LENDQ L RQK V R Q L		Pap1 (120-172)
EEKRQRNRQAQ A FRERRTEY I RQ L EST I K R NEES L Q T LQ N HRT A AD A Q L ML		meaB (50-102)
ALKRAR N TEAAR S RARKLQ R M K QLEDK V EEL L SK N YHLENE V AR L KK L Y G ER		Gcn4 (229-281)
* * * * *		
235 238 242 253 260 267 274 281		
239 243		

Figura I-2 Comparação da sequência dos domínios bZIP dos oito membros YAP de *S. cerevisiae* com as regiões correspondentes do Gcn4 e ortólogos em *Schizosaccharomyces pombe* (Pap1) e *Candida albicans* (Cap1). Na região básica, os resíduos que interagem directamente com os pares de bases (negrito de tamanho inferior) e os resíduos específicos dos YAPs (negrito de tamanho superior) são indicados. Na região “leucine zipper”, os resíduos de leucina conservados e outros, na posição **d** da estrutura “coiled coil” estão a negrito e os resíduos na posição **a** da mesma estrutura, estão sublinhados (Fernandes *et al.*, 1997).

No caso das proteínas Yap1-Yap4, o domínio de ligação ao DNA foi caracterizado como TTAC/GTAA, o qual difere do Gcn4 (TGAG/CTCA) (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004). O domínio de ligação ao DNA do Yap5 foi identificado como sendo TACTAA (Li *et al.*, 2008). No caso do Yap8, no entanto, foi identificada uma sequência de 13pb específica: TGATTAATAATCA (Ilina *et al.*, 2008) (Amaral *et al.*, resultados não publicados). Não foram ainda identificados domínios de ligação específicos para as proteínas Yap3 e Yap7.

Os membros Yap1 e Yap2 da família Yap apresentam grande homologia entre si, o Yap4 com o Yap6 e o Yap5 com o Yap7, sendo o Yap8 o elemento menos relacionado com os restantes membros da família (Fig. I-3).

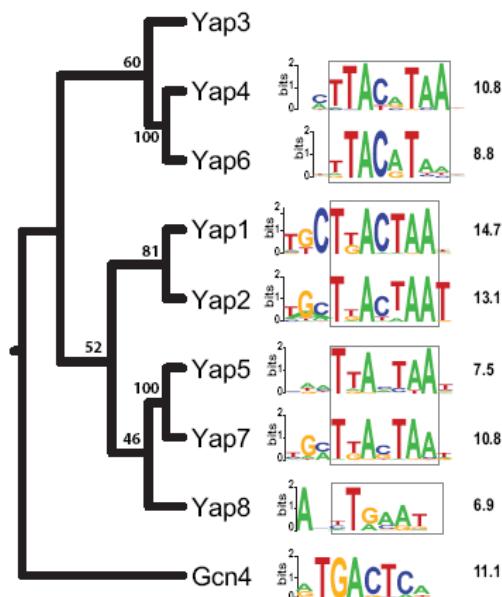


Figura I-3 Relação filogenética entre os diferentes membros da família Yap e sequências nucleotídicas dos seus domínios de ligação ao DNA (Tan *et al.*, 2008).

Vários estudos têm demonstrado que a família Yap está envolvida numa grande quantidade de respostas ao stress, incluindo o stress oxidativo (Yap1), cádmio (Yap2), osmótico (Yap4 e Yap6), arsénico (Yap1 e Yap8), térmico (Yap1), a uma variedade de drogas, entre outros. Aos membros Yap3 e Yap7 não foi ainda atribuída uma função específica (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010). O Yap5, recentemente foi associado à resposta ao excesso de ferro (Li *et al.*, 2008; Kaplan and Kaplan, 2009) e constitui o objecto de estudo deste trabalho, pelo que lhe dedicaremos particular atenção.

I.2.3.1 – O Yap 5 na resposta ao excesso de ferro – *estado da arte*

O ferro é um dos metais mais abundantes na Terra e é essencial para a grande maioria das formas de vida. Este elemento faz parte integral de várias proteínas e enzimas, sendo em humanos, um componente essencial das proteínas envolvidas no transporte de oxigénio (Dallman, 1986; Medicine, 2001).

As células eucarióticas (e a maior parte dos organismos procarióticos) requerem ferro, para sobreviver e proliferar, como constituinte de hemoproteínas, proteínas com clusters de ferro-enxofre (Fe-S) e proteínas que utilizam ferro noutros grupos funcionais para assegurar as funções fundamentais para o metabolismo celular. A carência deste elemento nas células bloqueia o seu crescimento e pode levar a morte celular (Hentze *et al.*, 2004).

A importância biológica do ferro é largamente atribuída às suas propriedades químicas como metal de transição, que prontamente, se envolve em reacções de oxidação-redução entre o seu estado férrico (3+) e ferroso (2+). Contudo, a mesma propriedade química explica também a toxicidade para a célula derivada de um excesso de ferro reactivo livre. No citoplasma, uma fracção significativa de ferro é reduzida e pode participar em reacções de Fenton:



Nesta, a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} pelo peróxido de hidrogénio provoca a libertação de radicais hidroxilo (OH^\bullet) que danificam membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos (Halliwell and Gutteridge, 1992).

A presença deste elemento em elevadas concentrações pode ser tóxica. No homem, a hemocromatose é uma doença que se traduz num depósito deste metal em vários órgãos, como o fígado, o pâncreas, o coração e a hipófise, levando à perda progressiva da sua função (Rouault, 2003; Dunn *et al.*, 2007).

Deste modo, e uma vez que tanto a carência como o excesso de ferro no organismo provocam a morte celular, os níveis de ferro reactivo têm que ser cuidadosamente controlados e limitados ao nível da sua internalização, armazenamento e distribuição intracelular (Hentze *et al.*, 2004).

Também em leveduras têm sido estudados os mecanismos envolvidos na resposta ao stress provocado por este metal. A levedura *S. cerevisiae* consegue prosperar num ambiente com

escassez ou excesso de ferro e sobreviver a grandes flutuações de disponibilidade deste elemento. A resposta à deprivação de ferro está particularmente bem estudada e consiste essencialmente em 3 vertentes: (i) activação dos sistemas de internalização de ferro, (ii) mobilização de ferro armazenado na célula, e (iii) adaptação metabólica à concentração limitante de ferro. Além disso, a resposta aparentemente é gradual, na medida em que diferentes graus de deprivação de ferro despoletam respostas de diferentes intensidades, sendo esta resposta mediada maioritariamente através de alterações ao nível da transcrição (Philpott and Protchenko, 2008).

Em *S. cerevisiae*, a resposta à deficiência de ferro é mediada por um factor de transcrição dependente de ferro, Aft1p (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995; Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996). Aft1 é constitutivamente expresso e quando os níveis de ferro intracelular diminuem, este factor concentra-se no núcleo activando a transcrição de uma bateria de genes-alvo e permitindo desta forma uma adaptação rápida do organismo ao ambiente que o rodeia (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002).

A regulação da localização celular do Aft1 requer a presença das monotiol-glutarredoxinas Grx3 e Grx4 (Ojeda *et al.*, 2006; Pujol-Carrion *et al.*, 2006). As glutarredoxinas são pequenas proteínas que actuam como tiol oxiredutases, sendo responsáveis por manter o equilíbrio redox ao nível celular, através da redução de pontes dissulfídicas (Herrero *et al.*, 2008).

A levedura *S. cerevisiae* possui duas ditiol-glutarredoxinas (Grx1 e Grx2) e três monotiol-glutarredoxinas (Grx3, Grx4 e Grx5) (Herrero *et al.*, 2008). Grx1 localiza-se no citoplasma e confere à célula protecção relativamente ao anião superóxido e ao peróxido de hidrogénio, enquanto Grx2 se encontra no citoplasma e na mitocôndria e confere protecção apenas ao peróxido de hidrogénio. Grx3 e Grx4 têm localização nuclear e como função regular a localização celular do factor de transcrição Aft1. Por sua vez, Grx5 está envolvido na síntese de centros Fe/S na mitocôndria.

Estruturalmente, Grx3 e Grx4 apresentam dois domínios distintos: tiorredoxina (Trx) e glutaredoxina (Grx). O primeiro é C-terminal e está relacionado com a presença de Grx4 no núcleo, mas não necessariamente com o controlo da actividade de Aft1, sendo esta função exercida pelo domínio Grx, N- terminal. Observou-se que Grx3, Grx4 e Aft1 formam um complexo nuclear, sendo que a ligação entre cada dois dos três membros do complexo não depende do terceiro membro. Aft1 liga-se aos domínios Grx e Trx de Grx3 e Grx4 (Pujol-Carrion *et al.*, 2006).

A sobreexpressão de Grx4 inibe a actividade de Aft1 no núcleo e a sua ausência, bem como de Grx3 permite uma deslocação parcial de Aft1 do citoplasma para o núcleo e activa consequentemente a transcrição dos genes envolvidos na deprivação de ferro (Herrero *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). O mecanismo através do qual é percebida a carência do elemento ferro, permanece no entanto ainda por explicar (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996; Philpott and Protchenko, 2008).

Ao contrário do que acontece na deficiência de ferro, os mecanismos subjacentes à resposta ao excesso de ferro têm sido pouco estudados. É conhecido que o transporte de ferro do citoplasma para o vacúolo é mediado por um importador identificado em plantas e fungos, o Ccc1 (Li *et al.*, 2001). Li *et al.* demonstraram claramente que *CCCI* codifica para um transportador que conduz à acumulação de ferro no vacúolo e que a sua deleção resulta numa diminuição da quantidade de ferro vacuolar armazenado, o que por sua vez afecta os níveis de ferro no citoplasma e o crescimento celular (Li *et al.*, 2001). Recentemente, os mesmos autores demonstraram também que a expressão de *CCCI* é controlada apenas pelo factor de transcrição Yap5 (Li *et al.*, 2008). Os autores demonstraram que a deleção deste factor de transcrição impede a sobrevivência celular num meio com excesso de ferro. Foi demonstrado ainda que o Yap5 é constitutivamente nuclear, ocupando a região promotora do gene *CCCI*, e que os níveis de expressão de Yap5 se mantêm constantes independentemente da concentração de ferro mas o

potencial de transactivação deste factor de transcrição é dependente desta concentração (Figura I-4).

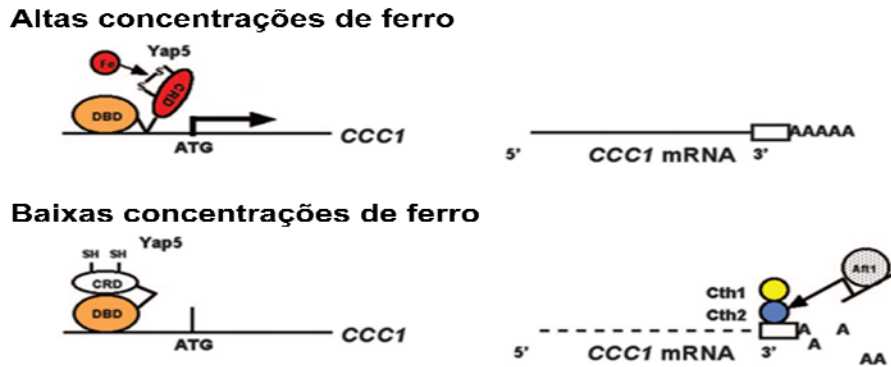


Figura I-4 Modelo de regulação do gene *CCC1* pelo Yap5 na presença de ferro. O Yap5 ocupa constitutivamente a região promotora do gene *CCC1*, e o ferro em elevadas concentrações provoca a modificação das ligações sulfidrílo, promovendo desta forma uma alteração conformacional do Yap5, levando ao aumento da actividade transcripcional do gene *CCC1* e consequentemente da importação de ferro para o vacúolo. Baixas concentrações de ferro intracelular levam à diminuição da actividade transcripcional do Yap5 e, consequentemente do gene *CCC1*. Por outro lado, à medida que a concentração de ferro no citoplasma diminui, o factor de transcrição Aft1 é activado. Os seus mais de 20 genes-alvo que incluem transportadores de membrana celular e vacuolar, levam a um aumento da concentração de ferro no citoplasma. Este factor de transcrição induz também a expressão do Cth2, que se liga ao mRNA do gene *CCC1*, estabilizando-o. A não transcrição do gene *CCC1* aliado a diminuição da estabilidade do seu mRNA diminui o transporte de ferro para o vacúolo, podendo desta forma concluir-se que a homeostase do ferro na célula é mantida através da coordenação da expressão dos transportadores de ferro da membrana celular e vacuolar (adaptado de (Li *et al.*, 2008)).

Objectivos

Este trabalho teve como objectivo o estudo do factor de transcrição Yap5 na presença de concentrações tóxicas de ferro e, através dos seus genes-alvo, nomeadamente o *CCC1*, tentar entender o seu mecanismo de regulação.

Capítulo II

Materiais e

Métodos

II.1 - Estirpes, condições de crescimento e análises de sensibilidade

As estirpes utilizadas neste trabalho encontram-se listadas na tabela II-1. O duplo mutante *Δyap5Δccc1* foi conseguido no nosso laboratório através do cruzamento das estirpes *Δyap5a* e *Δccc1* de forma a obter células diplóides, cuja esporulação foi posteriormente induzida em solução de acetato de potássio (KOAc) 2% suplementada com os aminoácidos para os quais cada estirpe é auxotrófica. Incubaram-se as células à temperatura ambiente e 40 rpm durante aproximadamente 8 horas e depois a 30°C até ao aparecimento de tétradas, visualizadas ao microscópio óptico. Aliquotaram-se 200μl da solução de KOAc com esporos e centrifugaram-se as células a velocidade máxima. O *pellet* foi lavado com água destilada estéril, os esporos ressuspensos em 200μl de solução zymoliase (0,5mg/mL) e incubados num banho a 37°C durante 10-20 minutos. Adicionou-se depois 1mL de água estéril e colocou-se o tubo em gelo. Foi espalhada uniformemente na superfície lateral de uma placa de YPD uma aliquota de 25μl de células e as tétradas foram dissecadas com recurso a um sistema “Singer Instruments MSM”. A placa contendo os esporos dissecados foi mantida numa estufa a 30°C durante aproximadamente 2 dias.

Os duplos mutantes foram identificados através de PCR de colónia utilizando primers específicos para *CCC1* e *YAP5* (tabela II-2).

As estirpes foram crescidas a 30°C em meio completo ou meio selectivo (SC ou SD: 0,67% “ammonium sulphate-yeast nitrogen base without amino acids” [Difco], 2% glucose, suplementado com os aminoácidos apropriados). Nos ensaios de northern e western blots, as células no início da fase exponencial (OD₆₀₀=0.4-0.5) foram induzidas com as concentrações de FeSO₄ indicadas e foram recolhidas nos tempos igualmente indicados. Os ensaios fenotípicos foram realizados através do plaqueamento de 5μl de diluições sequenciais de culturas no início da fase exponencial (aproximadamente de 2x10³ a 2x10⁸ células) em placas contendo meio suplementado com FeSO₄. O crescimento ocorreu durante dois dias a 30°C.

A estirpe EGY48 (Invitrogen) contendo pSH18-34 (plasmídeo contendo um gene repórter *Lac*) foi utilizada no ensaio do potencial de transactivação.

II.2 – Manipulação de DNA e plasmídeos

As construções do gene *CCCI* com a região promotora inteira ou truncada foram obtidas por PCR, utilizando DNA genómico da estirpe selvagem BY4742 como template e primers específicos (tabela II-2) e a enzima Phusion que tem função “proofreading” (Finnzymes). O produto de PCR foi purificado, o vector pRS416 digerido com a enzima de restrição *Sma*I (Fermentas), tendo os dois sido ligados utilizando a enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs), resultando na construção p*CCCI*_FP. A construção p*CCCI*_SP foi obtida através da digestão de p*CCCI*_FP com a enzima de restrição *Kpn*I (Fermentas). As deleções sequenciais da região promotora de gene *CCCI* foram conseguidas através de PCR com primers específicos (tabela II-2).

O local de ligação do Hap situado na posição -64bp na promotora do gene *CCCI* foi abolido através de mutação dirigida por PCR, utilizando a construção p*CCCI*_SP como template e o par de primers, Hap_KO_fwd e Hap_KO_rev (tabela II-2). O produto foi então digerido “overnight” com a enzima de restrição *Dpn*I (Fermentas) e usados para transformar a estirpe XL1-Blue de *E. coli*. Em todas as amplificações por PCR foi usada a enzima Phusion.

O gene *YAP5* foi amplificado por PCR com a enzima Phusion e o par de primers descrito na tabela II-2. Posteriormente o fragmento amplificado foi purificado e utilizado na reacção de ligação com o vector pRS416.

A inserção do epítipo HA no gene *YAP5* foi realizada do seguinte modo: o gene foi amplificado por PCR com o par de primers A1_yap5 e yap5_HA_rev (tabela II-2) e com o par de primers yap5_HA_fwd e A4_yap5 (tabela II-2). Ambos os fragmentos foram purificados e

utilizados como molde na reacção de PCR de fusão com o par de primers A1_yap5 e A4_yap5. O produto foi purificado e clonado no vector pRS416 previamente digerido com a enzima de restrição SmaI. A construção resultante denominou-se pRS416-yap5HA.

A estirpe de *Escherichia coli*, XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacI* [*F'**proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)*] (Stratagene)) foi transformada com as construções acima mencionadas segundo protocolos standard (Ausubel *et al.*, 1995). Células de *E. coli* crescidas durante a noite foram utilizadas para inocular 300mL de SOB (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 2,5mM KCl, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄). Este inóculo foi incubado a 37°C até ter sido atingida OD₆₀₀ 0,4-0,6. As células foram depois colocadas em gelo e centrifugadas a 4°C durante 10 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em 96mL de TB, seguindo-se uma incubação em gelo e centrifugação a 4°C durante 10 minutos. Adicionaram-se 24mL de TB, 1,68mL de DMSO, e incubou-se em gelo durante 10 minutos. 250µL de células foram transformados com a reacção de ligação acima descrita. Assim, às células competentes adicionou-se a reacção de ligação, incubou-se em gelo durante 30 minutos e deu-se o choque térmico a 42°C durante 30 segundos. Adicionaram-se 800µL de meio SOC (SOB suplementado com 20mM de glucose) a cada transformação e incubaram-se as células transformadas a 37°C durante 1 hora a 200rpm. Os transformantes foram plaqueados em meio LB- Luria Bertani (1% m/v bacto-triptona, 0,5 m/v extracto de levedura, 1% m/v NaCl, pH 7) suplementado com 100µg/mL de ampicilina, 40µL de X-Gal (40µg/mL) e 100µL de IPTG (100mM). As colónias brancas foram crescidas a 37°C em meio LB líquido suplementado com ampicilina. Após a extracção do plasmídeo (ZR plasmid miniprep – classic, Zymo Research) e testadas por digestão com a enzima de restrição *NcoI* (New England Biolabs).

A sequência de todas as construções foi confirmada por sequenciação.

Os plasmídeos contendo sequências consenso (pCM64-CTH2-FeRE-CYC1-LacZ) ou mutantes (pCM64-CTH2-FeRE-CYC1-LacZ M3) de ligação de Aft1 da promotora do gene

CTH2 fundida com um repórter LacZ a promotora do gene *CYC1* (Puig *et al.*, 2005), foram oferecidos pelo Dr. D. Thiele (Duke University Medical Center, Durham, NC).

O plasmídio Yap5-LexA utilizado neste trabalho já foi descrito anteriormente (Fernandes *et al.*, 1997).

II.3 – Preparação de células competentes de levedura

O procedimento de transformação de leveduras usado foi o protocolo descrito por Gietz *et al* (Gietz and Schiestl, 1991) com modificações. Células em fase estacionária foram utilizadas para inocular 20mL de meio YPD (1% extrato de levedura, 2% de bactopectona, 2% glucose) a uma OD₆₀₀ de partida de 0,1 e cresceram a 30°C com agitação até atingirem uma OD₆₀₀ 0,7. Posteriormente, as células foram centrifugadas, ressuspensas em água destilada estéril e transferidas para um tubo Eppendorf 1,5mL. Depois de centrifugadas mais uma vez as células foram ressuspensas em TE 1X/LiAc 100mM estéril preparado de fresco e guardadas a 4°C.

II.4 – Transformação de levedura

Às células competentes foram adicionados 0,1µg/µl do plasmídeo a transformar, 0,1mg/ml de DNA de esperma de salmão (Sigma) e 6x o volume de uma solução 40% w/v PEG3340 em LiAc (LiAc 100mM, TE 1X). Após incubação durante 40 minutos a 30°C com agitação, deu-se o choque térmico a 42°C e lavou-se com água. Depois de centrifugado, plaqueou-se em meio selectivo e as células transformadas foram crescidas durante dois dias a 30°C.

II.5 - Preparação de amostras de RNA e análise por Northern Blot

O isolamento de RNA foi feito de acordo com (Menezes *et al.*, 2008). O RNA foi extraído de culturas celulares na fase exponencial de crescimento quer tratadas com sulfato de ferro (FeSO_4) ou não. Aproximadamente 40 μg do RNA total de cada amostra foram misturadas com uma solução 58% v/v formamida 99,5%, 21% v/v formaldeído 37% e 9% v/v “loading dye” (0,25% m/v azul de bromofenol, 0,25% m/v cianol de xileno, 50% v/v glicerol 87% em 1mM EDTA pH8) em 12% v/v MOPS 10X (0,4M MOPS, 0,1 M NaAc, 0,1M EDTA pH8, pH final de 7, acertado com NaOH). A mistura foi aquecida durante 15 minutos a 65°C. Posteriormente, as amostras foram carregadas em gel de agarose e formaldeído em MOPS 10X (72% m/m agarose, 10% v/v MOPS 10X e 7% v/v formaldeído em água bidestilada estéril) durante 4 horas a 90V. Finda a corrida electroforética, o gel foi lavado em água durante 20 minutos e foi feita a transferência para a membrana de nylon (Hybond XL, Amersham Pharmacia Biotech) em SSC 10X (1,5M NaCl, 0,15M citrato de sódio dihidratado, pH/ ajustado com HCl).

As sondas foram obtidas por PCR com o par de primers *CCCI_fwd* e *CCCI_rev* (para a sonda *CCCI*) (ver tabela II-2). O *U3*, um pequeno RNA nuclear, foi usado como controlo da quantidade de RNA das amostras (Menezes *et al.*, 2008). As sondas foram marcadas utilizando primers aleatórios com [α - ^{32}P]ATP utilizando o kit MegaPrime, (GE Healthcare da Amersham). Após pré-incubação da membrana com uma solução de hibridação (7% v/v SDS, 1 mM EDTA, 1% v/v BSA, 0,25M NaPO_4) a 60°C durante 2 horas foi realizada a hibridação também a 60°C durante 16 horas com sondas específicas, como descrito em (Menezes *et al.*, 2008). Após a hibridação, a membrana foi lavada com solução de lavagem (0,1 v/v SDS, 1mM EDTA, 20mM NaPO_4) e exposta a um filme autoradiográfico (Hyperfilm MP, Amersham).

II.6 - Medição da actividade da β -Galactosidase

A actividade relativa da β -Galactosidase foi medida em meio líquido SD como descrito em (Mockli and Auerbach, 2004). As células foram crescidas em meio líquido SD até à fase inicial do crescimento exponencial, induzidas com 2mM de FeSO_4 durante 1 hora e recolhidas. Depois da permeabilização com clorofórmio, a actividade da enzima foi monitorizada através da degradação do substrato colorimétrico ONPG (o-nitrophenyl-b-D-galactopyraniside) a $\text{OD}_{420\text{nm}}$.

II.7 – Purificação e análise de proteínas por Western Blot

A estirpe *yap5* foi transformada com o plasmídeo pRS416-*yap5HA*. Para a extracção de proteínas totais foram recolhidos 30 ml de cultura celular antes e após a incubação com 2mM ou 5mM de FeSO_4 . As células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em tampão de extracção de proteínas (50mM HEPES pH7.5, 100mM KCl, 1mM EDTA, 0,1% NP-40, 10% glicerol em água bidestilada). A parede celular foi lisada mediada pela adição de pérolas de vidro e agitação durante 5 minutos. Depois de centrifugar durante 20 minutos, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C . As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford-BIORAD). Todo o procedimento foi executado à temperatura de 4°C .

O gel de resolução de poliacrilamida 12% (w/v) foi preparado misturando diferentes componentes nas seguintes proporções: 12mL de acrilamida/bis-acrilamida (30%/0,8% w/v), 7,5mL de Tris-HCl 1,5M pH 8.8, 150 μL de SDS 20% (w/v), 10,2mL de H_2O destilada e estéril, 150 μL de PSA 10% (w/v) e 20 μL de TEMED. Após a polimerização do gel de resolução foi preparado o gel de concentração 4% (w/v) misturando os seguintes componentes: 670 μL de acrilamida/bis-acrilamida (30%/0,8% w/v), 1,25mL de Tris-HCl 0,5M pH 6.8, 25 μL de SDS 20% (w/v), 3,075 mL de H_2O destilada e estéril, 25 μL de PSA 10% (w/v) e 5 μL de TEMED. Após a polimerização do gel, os poços foram lavados com tampão de corrida SDS-PAGE 1X

(stock 10X: Tris 250mM, glicina 2M e 1% (w/v) de SDS). A electroforese foi realizada no sistema BioRad Mini-Protean II e decorreu a 100V em tampão de corrida SDS-PAGE 1X até as amostras atingirem o final do gel.

Após a electroforese, o gel contendo as amostras de proteína foi imediatamente embebido em tampão de transferência durante 10 minutos. Três folhas de papel 3MM (Whatman) do tamanho do gel foram previamente embebidas no mesmo tampão de transferência e colocadas no ânodo do aparelho de transferência “ATTA Trans-Blot SD Transfer Cell”. A membrana de nitrocelulose previamente imersas também em tampão de transferência foi colocada em cima das folhas de papel 3MM e o gel foi colocado sob mais 3 folhas de papel 3MM. O cátodo foi colocado sobre a montagem de transferência e a corrente eléctrica foi ajustada para 20V durante 1 hora. A eficiência da transferência das proteínas foi assegurada incubando-se a membrana com solução Ponceau S (30% (w/v) TCA e 30% (w/v) ácido sulfosalicílico diluída 1:10 com água bidestilada estéril).

A membrana de nitrocelulose foi imersa numa solução T1 (PBS 1X, 0,1%Tween 20) com 5% (w/v) de leite em pó e incubada à temperatura ambiente durante 1 hora, com agitação lenta de forma a bloquear-se a absorção não-específica de reagentes imunológicos. A membrana foi lavada com a mesma solução e incubada com o anticorpo específico (anti-HA e p23) sendo que o tempo de incubação dependeu do anticorpo usado. Posteriormente a membrana foi lavada três vezes durante 10 minutos com solução T1 e incubada com o anticorpo secundário nos casos em que foi necessário (anti-p23). Finalmente, a detecção foi realizada usando o sistema de detecção químio-luminescente ECL (Amersham, Pharmacia). A membrana foi então exposta a um filme autoradiográfico (Hyperfilm MP, Amersham).

Estirpe	Genótipo	Fonte
Byα	By4742; MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0	EUROSCARF
yap5	By4742; MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YIR018w::kanMX4	EUROSCARF
yap5a	BY4741; MATα; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YIR018w::kanMX4	EUROSCARF
ccc1	By4742; MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YLR220w::kanMX4	EUROSCARF
hap4	By4742; MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0	Este trabalho
yap5hap4	By4742; MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YIR018w::kanMX4	Este trabalho
yap5ccc1	By4742; MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLR220w::kanMX4	Este trabalho

Tabela II-1 Estirpes de *S.cerevisiae* utilizadas

Primer	Sequência	Utilização
A1_CCC1	5'TACAGGACCAAACCCCTCAG3'	Clonagem do CCC1 e PCR
A4_CCC1	5'GGCTCTTGGCAATAGAAAA3'	
CCC1_fwd	5'AACGCAGTGGTGACCCTTAT3'	Northern Blot
CCC1_rev	5'ACCACCCACAACAACCATTT3'	
pCCC1_-58	5'TGGTATATTGAACAAAGAAA3'	Delecção das regiões promotora e terminadora do CCC1
pCCC1_-90	5'GAACGAAGCCTTTAGACTCT3'	
pCCC1_-114	5'GGTTTATAGAAATAGAAATATAAC3'	
pCCC1_-123	5'GTAAAGCGACATCACTCTC3'	
pCCC1_-198	5'GATTATATATGAAAAATTGATACAAAAC3'	
pCCC1_-240	5'CTTTGTTAGCCCGAATGTCTC3'	
pCCC1_-261	5'GTGACCCGCATTTTTTGTCTT3'	
pCCC1_-stop	5'TTAACCCAGTAACTTAACAAAG3'	
Hap4_KO_fwd	5'ATGACCGCAAAGACTTTTCTACTACAGGCCTCCGCTAGTATCGTACGCTGCAGG3'	Delecção do HAP4
Hap4_KO_rev	5'TCAAAATACTTGTACCTTTAAAAAATCGACATCTTCGTCTTAGGGAGACCGGCAGAT3'	
Hap4_SD_fwd	5'CTTTAGACTCTTTTTTTTATTTATATTGAACAAAGAAAC3'	Mutagénesse dirigida
Hap4_SD_rev	5'GTTTCTTTGTTCAATATAAAATAAAAAAAGAGTCTAAAG3'	
A1_Yap5	5'CAAAACTGTGGTGTAG3'	Clonagem do YAP5
A4_Yap5	5'GAATGTATAGGCATAGTAAG3'	
Yap5_HA_fwd	5'CCGGTCCATCATCCACATGTACCATACGATGTTCCAGATTACGCTTGAAGAGAGAGAACTTCTTAATAC3'	Western Blot
Yap5_HA_rev	5'GTATTAAGAAGTTCTCTCTCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGTGGATGATGGACCGG3'	

Tabela II-2 Primers utilizados neste trabalho

Capítulo III

Resultados e

Discussão

Neste trabalho pretendemos estudar a importância do factor Yap5 na homeostase do ferro, bem como a regulação da expressão do gene *CCCL*.

III.1 – A expressão do Yap5 diminui na presença de elevadas concentrações de ferro.

Todos os membros da família Yap até agora estudados estão incluídos numa de duas classes: (i) factores constitutivamente nucleares com regulação ao nível transcricional após o stress – Yap4 e Yap6 (Nevitt *et al.*, 2004) – (ii) factores citoplasmáticos com localização nuclear após o stress – Yap1, Yap2 e Yap8 (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010). No que se refere ao Yap5, Li *et al* demonstraram que o Yap5 tem localização nuclear constitutiva (Li *et al.*, 2008).

De forma a averiguar se à semelhança dos Yaps 4 e 6, a expressão do Yap5 aumenta após o stress, monitorizámos por western blot a expressão do Yap5 conjugado com o epítipo HA. Os nossos resultados demonstram claramente que a expressão do Yap5 diminui após a incubação durante 30 e 60 minutos com 2mM de sulfato de ferro (figura III-1).

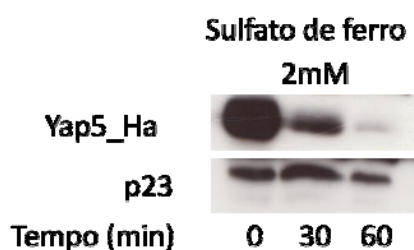


Figura III-1 Expressão do Yap5 em células da estirpe *yap5* transformadas com a construção Yap5_HA quando expostas a 2mM de sulfato de ferro durante 30 e 60 minutos.

A análise da expressão do Yap5 para intervalos de tempo mais curtos (figura III-2) revelou que após 5 minutos de incubação com ferro já se observa uma diminuição acentuada dos níveis

da proteína. Após o stress, a expressão do Yap5, ao contrário do Yap4 e Yap6, diminui para além dos níveis basais de expressão.

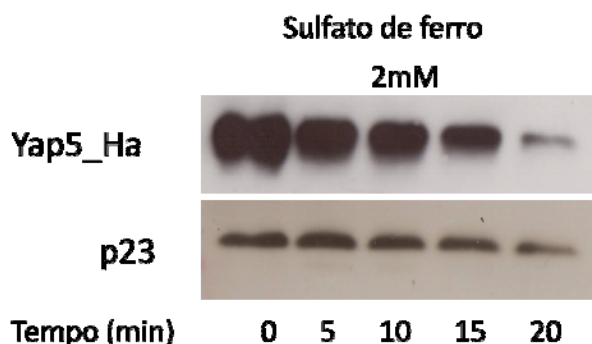


Figura III-2 Expressão de Yap5 em células da estirpe *yap5* transformadas com a construção Yap5_HA quando expostas a 2mM de sulfato de ferro durante os tempos indicados.

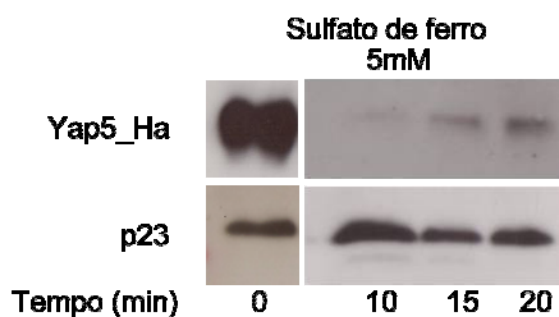


Figura III-3 Expressão de Yap5 em células da estirpe *yap5* transformadas com a construção Yap5_HA quando expostas a 5mM de sulfato de ferro durante os tempos indicados.

Verificámos ainda que a expressão de Yap5 ao longo do tempo diminui de uma forma mais acentuada com o aumento da concentração de sulfato de ferro (figura III-3).

Para averiguar se a regulação da expressão do Yap5 é transcricional ou pós-transcricional, realizámos ensaios de northern blot com sondas específicas para o Yap5. No entanto, mesmo no ponto sem stress não detectamos expressão do gene. É possível que tal seja devido a uma baixa expressão deste, pelo que experiências de PCR em tempo real com primers específicos para o Yap5 (uma técnica mais sensível) estão em curso.

Neste trabalho, através de uma abordagem directa, medimos o potencial de transactivação do Yap5 na presença de ferro. A actividade do gene repórter *lacZ* sob o controlo de uma promotora com a sequência de ligação do LexA foi medida em células que co-expressavam a quimera Lex-Yap5. A actividade do repórter aumenta após incubação com ferro (figura III-4). Os nossos resultados corroboram os de Li *et al* que através de um método indirecto também verificaram que o potencial de transactivação do Yap5 aumenta após o stress (Li *et al.*, 2008).

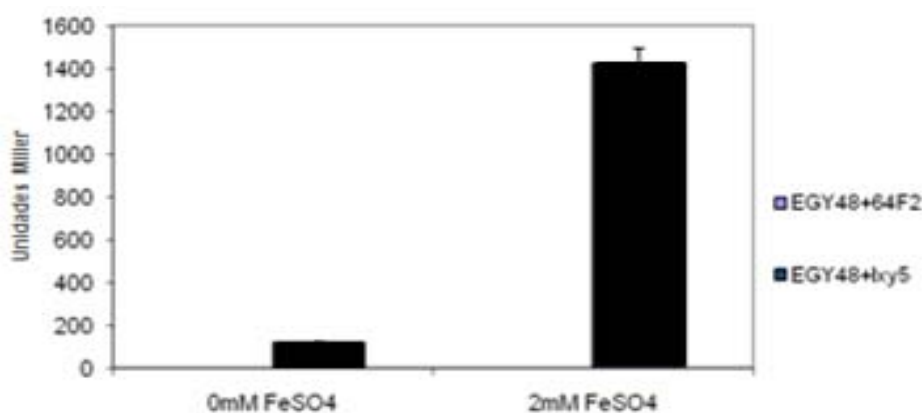


Figura III-4 Potencial de transactivação do Yap5 na presença de ferro. Células co-expressando a quimera Lex-Yap5 e uma cassette repórter contendo o gene *lacZ* sob o controlo de uma promotora com a sequência de ligação do LexA foram crescidas em meio líquido na ausência ou presença (incubação de 20 minutos) de sulfato de ferro. Os valores da actividade β -galactosidase (média de três transformantes independentes) foram normalizados para OD₆₀₀.

O potencial de transactivação do Yap5 aumenta drasticamente na presença de ferro, após 20 minutos de incubação com 2mM de sulfato de ferro. No entanto, nesse ponto os níveis de proteína estão diminuídos (figura III-2). Assim, como o Yap5 é constitutivamente nuclear (Li *et al.*, 2008) e como o seu potencial de transactivação é muito alto na presença de ferro ((Li *et al.*, 2008) e figura III-4), a diminuição drástica dos níveis da proteína (figura III-2) poderá ser a forma que a célula possui de regular/modular a actividade deste factor de transcrição.

III.2 – O crescimento do mutante *yap5* é apenas ligeiramente afectado na presença de elevadas concentrações de ferro.

Li *et al* demonstraram ainda que o Yap5, uma vez activado pelo ferro leva ao aumento da expressão do *CCC1*, o único transportador vacuolar de ferro em leveduras, ajudando desta forma a restabelecer a homeostase deste elemento (Li *et al.*, 2008). No entanto, a sensibilidade exibida pelo mutante *ccc1* quando exposto a elevadas concentrações de ferro é muito superior quando comparada com a sensibilidade do mutante *yap5* (figura III-5).

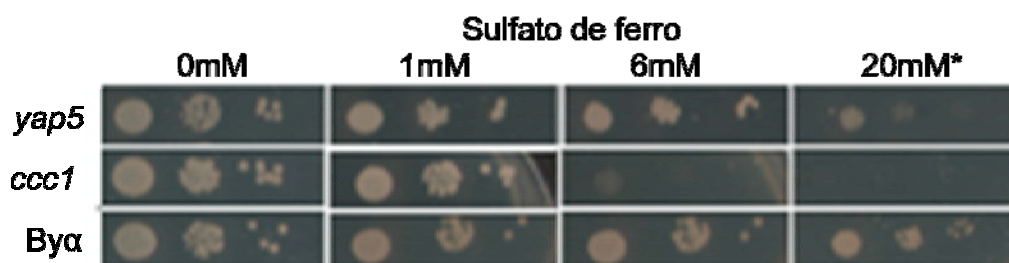


Figura III-5 Crescimento das estirpes mutantes e selvagem (By4742) durante 48h ou 24h (*) em meio sintético completo sólido suplementado com 1mM, 6mM e 15mM de sulfato de ferro.

A sensibilidade do mutante *ccc1* é notória quando as células são crescidas em meio contendo concentrações de sulfato de ferro iguais ou superiores a 6mM. O crescimento do mutante *yap5* é ligeiramente comprometido quando a concentração de sulfato de ferro atinge 20mM.

Ao avaliarmos a expressão de *CCC1* como resposta ao ferro verificámos que este gene é mediado pelo Yap5, sendo esta resposta dependente da concentração de ferro no meio (figura III-6 A e B).

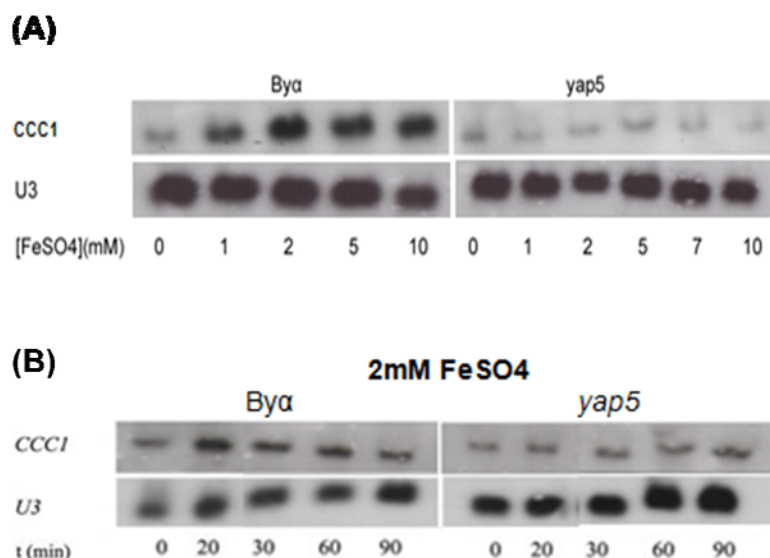


Figura III-6 Expressão do gene *CCC1* em células da estirpe selvagem e *yap5* quando expostas a diferentes concentrações crescentes de sulfato de ferro durante 20 minutos (A). A indução do *CCC1* em condições de presença de ferro é dependente do Yap5. Células “wild type” e mutantes *yap5* foram induzidas com 2mM FeSO_4 , recolhidas nos tempos indicados e analisou-se a expressão génica por Northern blot (B).

No conjunto, todos estes dados sugerem que (i) na ausência do Yap5 uma possível via alternativa, independente do *CCC1*, poderá ser activada, ou (ii) os níveis basais de expressão do *CCC1* independentes de ferro (figura III-6) são suficientes para permitir o seu crescimento em altas concentrações de ferro.

III.3 – Os níveis basais de *CCC1*, não dependentes do Yap5, são suficientes para o crescimento em altas concentrações de ferro.

Para testar a nossa primeira hipótese, construímos um duplo mutante *yap5ccc1*. Se a ausência do Yap5 fosse o sinal indutor da possível via alternativa, então o mutante *yap5* iria exibir uma sensibilidade similar à apresentada pelo duplo mutante *yap5ccc1*. Contudo, o duplo mutante apresenta uma sensibilidade similar à do mutante *ccc1* (figura III-7) e portanto, afastámos esta hipótese.

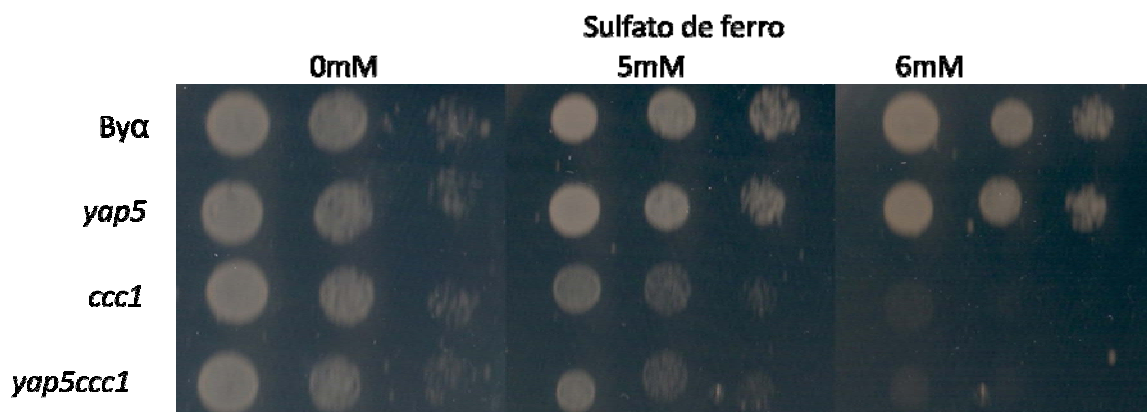


Figura III-7 O duplo mutante *yap5ccc1* e o mutante *ccc1* exibem o mesmo fenótipo de crescimento quando as células são induzidas na presença de ferro. O mesmo número de células das estirpes indicadas foi plaqueado em meio SC sólido (sintético completo) suplementado com 5 e 6mM FeSO_4 . O crescimento foi monitorizado durante 48h a 30°C.

Posteriormente e de forma a perceber se os níveis de expressão basal de *CCC1* seriam suficientes para permitir o crescimento em concentrações tóxicas de ferro, foi feita uma construção contendo o gene *CCC1* e a sua promotora sem os três YRE (Yap Responsive Elements), localizados a -398pb, -359pb e a -303pb a partir do codão de iniciação, ATG. Esta construção, contendo apenas 273pb da região promotora (*CCC1_SP*, do inglês “small promoter”), foi usada para transformar a estirpe mutante *ccc1* e o crescimento foi feito em meio sólido suplementado com sulfato de ferro (figura III-8).

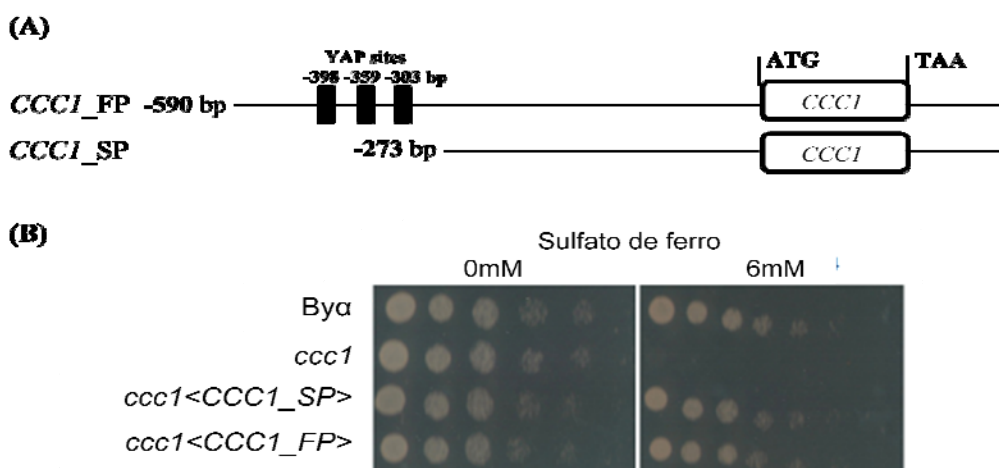


Figura III-8 Representação esquemática das construções *CCC1_FP* (do inglês “full promoter”) e *CCC1_SP* utilizadas para transformar a estirpe *ccc1* (A). A sensibilidade do mutante *ccc1* é suprimida pela complementação com a construção que consiste no gene *CCC1* sob o controle de uma versão truncada da sua promotora, sem os YREs (*CCC1_SP*). A estirpe *ccc1* reconstituída com a versão nativa da promotora do *CCC1*, *ccc1<CCC1_FP>*, não difere, em termos de crescimento em condições de excesso de ferro, da estirpe *ccc1<CCC1_SP>*. O crescimento das estirpes indicadas em meio selectivo sólido suplementado com 6mM de sulfato de ferro foi monitorizado durante 48h a 30°C (B).

Verificámos que as células mutantes *ccc1* contendo a versão truncada da promotora do *CCCI* (*CCCI_SP*) conseguem suprimir a sensibilidade no crescimento verificada para a estirpe *ccc1*, sugerindo claramente que os níveis de expressão deste gene, não dependentes de ferro (figura III-6), são suficientes para conferir às células a capacidade de controlar o stress provocado pelo excesso de ferro.

III.4 – Análise funcional da região promotora do gene *CCCI*.

Como demonstrámos, os níveis de *CCCI* ditados por uma região de 273pb (figura III-8) conferem à célula a capacidade de crescer em meio com altas concentrações de ferro. O factor de transcrição responsável pelos níveis basais deste transportador deve pois reconhecer uma sequência localizada nessa região. Assim, com o objectivo de identificar esse factor, foi feita uma pesquisa de sequências reguladoras (“cis-elements”) conhecidas, nessa região, utilizando o motor de busca da base de dados YEASTRACT (Teixeira *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2008). Apenas foram encontrados oito factores de transcrição que se encontram listados na tabela III-1.

Factor de transcrição	Sequência	Localização*
Msn2p, Msn4p, Nrg1p, Rph1p	CCCCT	-270
Rtg1p, Rtg3p	GGTAC	-268
Gis1p, YER130C	AGGGG	-265
Swi4p	CACGAAA	-259
Rtg1p, Rtg3p	GTCAC	-257
Stb5p	CGGNS	-228
Ash1p	YTGAT	-183
Ash1p	YTGAT	-151
Hap2P, Hap3p, Hap4p, Hap5p	TNATTGGT	-64

Tabela III-1 Potenciais factores de transcrição do gene *CCCI*. (*) a partir do ATG

Deste conjunto, o Hap4 foi o que nos interessou particularmente, apesar do seu local de ligação ser muito perto da TATA box (tabela III-1). Hap4 é uma subunidade do complexo Hap2/3/4/5 que reconhece a sequência CCAAT, é reprimido pela glucose e activado pelo heme (Forsburg and Guarente, 1989; Mercier *et al.*, 2006; Mercier and Labbe, 2009). É um activador transcripcional e um regulador global da expressão de genes envolvidos na respiração e funciona como o activador do complexo Hap (Forsburg and Guarente, 1989). Na levedura *Schizosaccharomyces pombe*, o ortólogo do *HAP4* (*PHP4*) regula o ortólogo do *CCCI* (*PCLI*) (Mercier *et al.*, 2006). Com base em estudos anteriores foi proposto um modelo de inibição do *php4* na presença de ferro. Numa fase inicial em condições de excesso de ferro, Fep1 (ortólogo do Aft1 de *S.cerevisiae*) liga-se à promotora do *php4* inibindo a sua expressão. Posteriormente, ao nível pós-transcripcional, a função do Php4 é inactivada através da acção da monotiol glutaredoxina Grx4 (um target do Yap5 em *S. cerevisiae* identificado por *microarrays* de DNA, Pimentel *et al.*, resultados não publicados), induzindo a expressão dos seus genes alvo, entre eles o *pcl1*. Finalmente, o complexo Php4-Grx4 é exportado do núcleo para o citoplasma via Crm1, permitindo a continuidade da expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas na destoxificação do ferro até ser reposta a homeostase na célula (Mercier and Labbe, 2009). Além disso, existem diversos estudos “chip-on-chip” que revelam que o complexo Hap se liga à promotora do *CCCI* (Lee *et al.*, 2002; Harbison *et al.*, 2004; Workman *et al.*, 2006).

Assim sendo, decidimos testar se o local de ligação Hap na promotora do *CCCI* é funcional. Para este fim, eliminámos o local de ligação do Hap na construção *CCCI_SP*, através de mutagénese dirigida, e utilizámos a construção resultante (*CCCI_sp_HapM*) para transformar células *cccI*. Uma vez que estas células cresceram em meio suplementado com excesso de ferro (figura III-9B) concluímos que o local de ligação do Hap testado não é relevante para a expressão do *CCCI*.

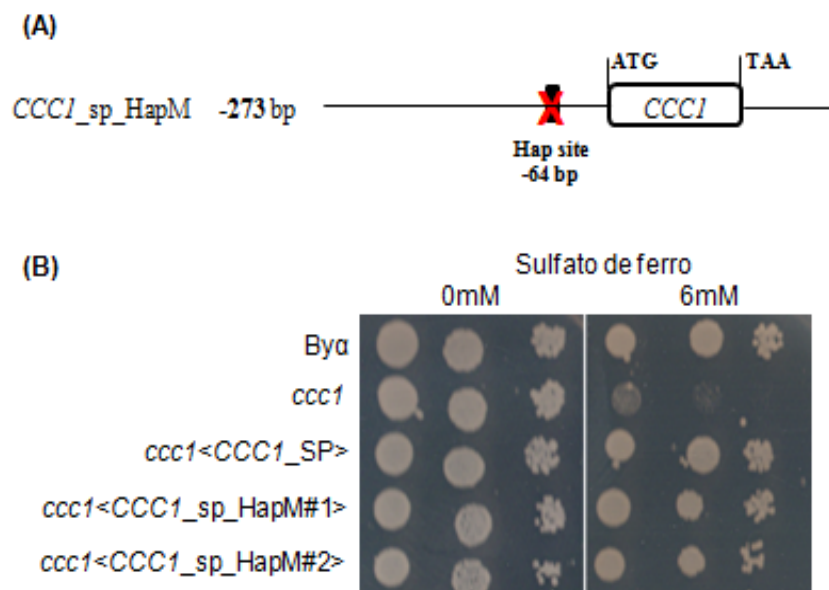


Figura III-9 Representação esquemática da construção *CCC1_sp_HapM* utilizada para transformar células *ccc1* (A). A sensibilidade do mutante *ccc1* é suprimida pela complementação com a construção que consiste no gene *CCC1* sob o controlo de uma versão truncada da sua promotora, sem a sequência consensus do Hap (*CCC1_sp_HapM*). A estirpe *ccc1* reconstituída com a versão truncada da promotora do *CCC1*, *ccc1<CCC1_SP>*, não difere, em termos de crescimento em condições de excesso de ferro, da estirpe *ccc1<CCC1_sp_HapM>*, sendo a nomenclatura *CCC1_sp_HapM#1* e *CCC1_sp_HapM#2* referentes a duas transformações independentes da mesma construção. O crescimento das estirpes indicadas em meio selectivo sólido suplementado com 6mM de sulfato de ferro foi monitorizado durante 48h a 30°C (B).

Para eliminar a hipótese de que o Hap4 poderia estar a regular indirectamente a expressão do *CCC1*, construímos o mutante *hap4* e o duplo mutante *yap5hap4* e testámos o seu crescimento na presença de ferro (figura III-10). Observámos que ambas as estirpes conseguem crescer. Assim sendo, concluímos que o Hap4 não parece estar envolvido na regulação do nível de expressão basal do *CCC1*.

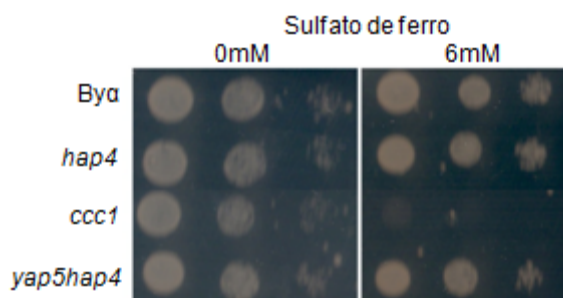


Figura III-10 Para confirmar que o Hap4 não está de facto a regular a expressão do *CCC1*, o mutante *hap4* e o duplo mutante *yap5hap4* foram construídos e o seu crescimento monitorizado em meio selectivo sólido suplementado com 6mM de sulfato de ferro durante 48h a 30°C. Não foi verificada nenhum comprometimento no crescimento das estirpes mutantes testadas *hap4* e *yap5hap4*

Uma vez afastado o Hap4 como regulador da expressão do *CCC1* e para descobrir qual o factor de transcrição que regula o nível de expressão basal deste gene, fizemos várias construções através de PCR com primers específicos (tabela II-2) de forma a obter deleções sequenciais da região promotora do *CCC1* (Figura III-11), abolindo assim as sequências consensus listadas na tabela III-1.

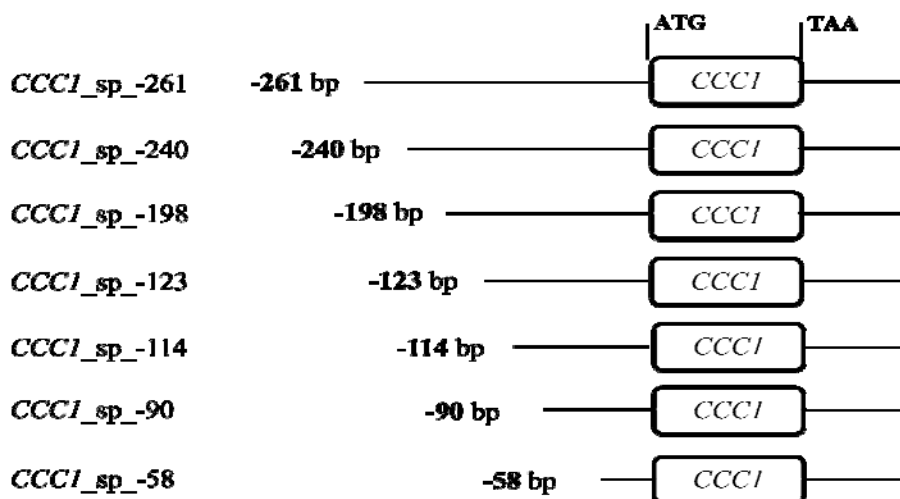


Figura III-11 Representação esquemática das construções contendo deleções sequenciais da região promotora do *CCC1*.

Estas construções foram posteriormente utilizadas para transformar células da estirpe *ccc1* e o seu crescimento foi monitorizado em meio selectivo sólido suplementado com sulfato de ferro, de forma a avaliar o seu envolvimento na regulação do *CCC1* (figura III-12).

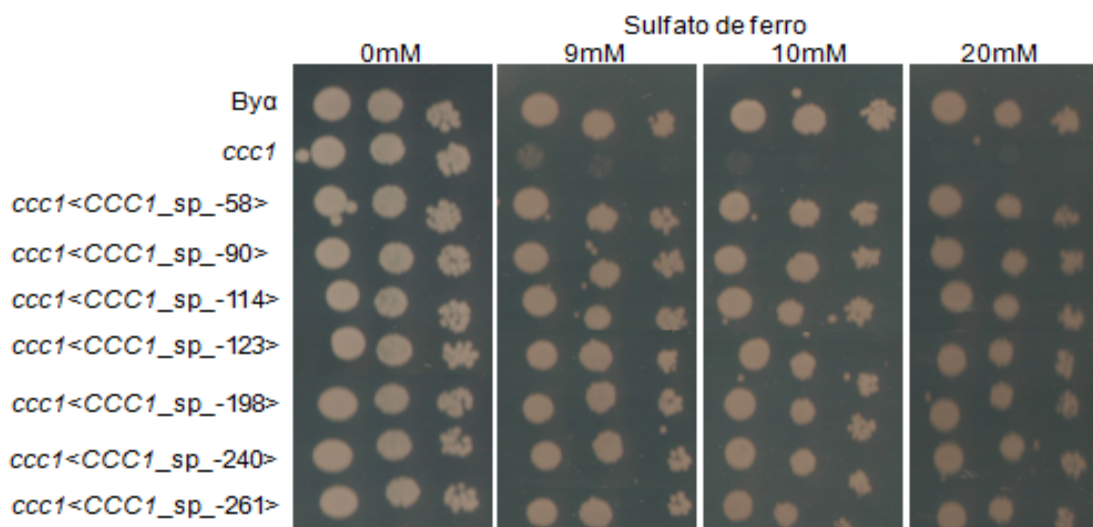


Figura III-12 A estirpe *ccc1* foi transformada com as diversas construções descritas (figura III-11) e o seu crescimento monitorizado em meio sólido selectivo suplementado com sulfato de ferro durante 24h a 30°C.

Nenhuma das construções reverteu o fenótipo de sensibilidade da estirpe mutante *ccc1* (figura III-12)

Como -58pb a montante do codão de iniciação, ATG, é suficiente para conferir à estirpe mutante a capacidade de sobreviver em meio suplementado com grandes quantidades de ferro, levantamos a hipótese de na região 3'UTR deste gene poder existir elementos reguladores.

III.5 – Importância da região 3'UTR na regulação da expressão do gene *CCC1*.

De forma a averiguar a relevância da região 3'UTR (do inglês “untranslated region”) na regulação do gene *CCC1*, uma nova construção foi feita, tendo sido retirada a região terminadora do gene *CCC1* a jusante do codão stop, TAA, tanto na construção *CCC1_FP* como na construção *CCC1_SP* (figura III-13A). As construções resultantes (*CCC1_fp_stop* e *CCC1_sp_stop*) foram utilizadas posteriormente para transformar células da estirpe *ccc1* e o seu crescimento monitorizado em meio selectivo sólido suplementado com sulfato de ferro (figura III-13B).

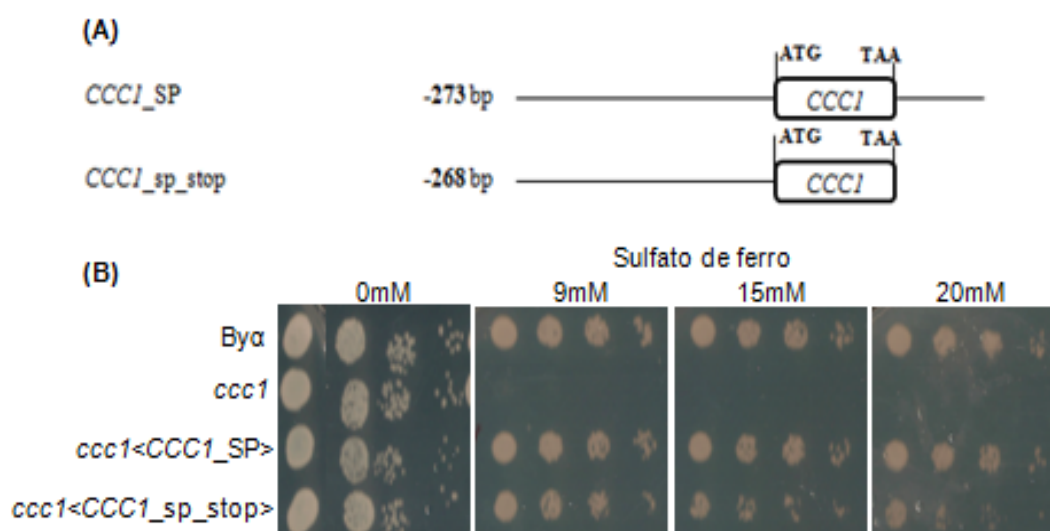


Figura III-13 Representação esquemática das construções *CCC1_SP* e *CCC1_sp_stop* (A). A estirpe mutante *ccc1* foi transformada com ambas as construções e o seu crescimento monitorizado durante 48h a 30°C em meio sólido suplementado com as concentrações de sulfato de ferro indicadas. Podemos verificar um comprometimento ligeiro do crescimento das células transformadas com a construção *CCC1_sp_stop* para altas concentrações de ferro (B).

Verificámos que a região 3'UTR é efectivamente importante na regulação do gene, principalmente para grandes concentrações de ferro.

Sabe-se que nas regiões transcritas mas não traduzidas de alguns genes envolvidos no metabolismo do ferro, existem elementos de resposta ao ferro (IREs ou “iron responsive elements”). Estes elementos consistem em pequenas estruturas “stem-loop” ou “hairpin” (Eisenstein and Ross, 2003). O controlo da expressão destes genes ou da estabilidade do seu mRNA é realizado através da ligação das proteínas de resposta ao ferro (IRPs ou “iron responsive proteins”) a estas estruturas. Foram identificados vários membros contendo IREs em vertebrados, invertebrados, eucariotas inferiores e procariotas. São exemplos a ferritina em vertebrados, a succinato desidrogenase (*SDH*) em *Drosophila melanogaster* (todas contendo IREs situados na região 5'UTR), o receptor da transferrina (TfR1) e um transportador de metal divalente (*DMT1*) (ambas contendo IREs situados na região 3'UTR) (Hentze and Kuhn, 1996; Eisenstein and Ross, 2003; Leipuviene and Theil, 2007; Goforth *et al.*, 2010).

A pesquisa de estruturas semelhantes na região 3'UTR do gene *CCCI* revelou a presença de um “hairpin” logo depois do codão STOP (figura III-14). Assim, será interessante no futuro avaliar se esta estrutura é ou não funcional.

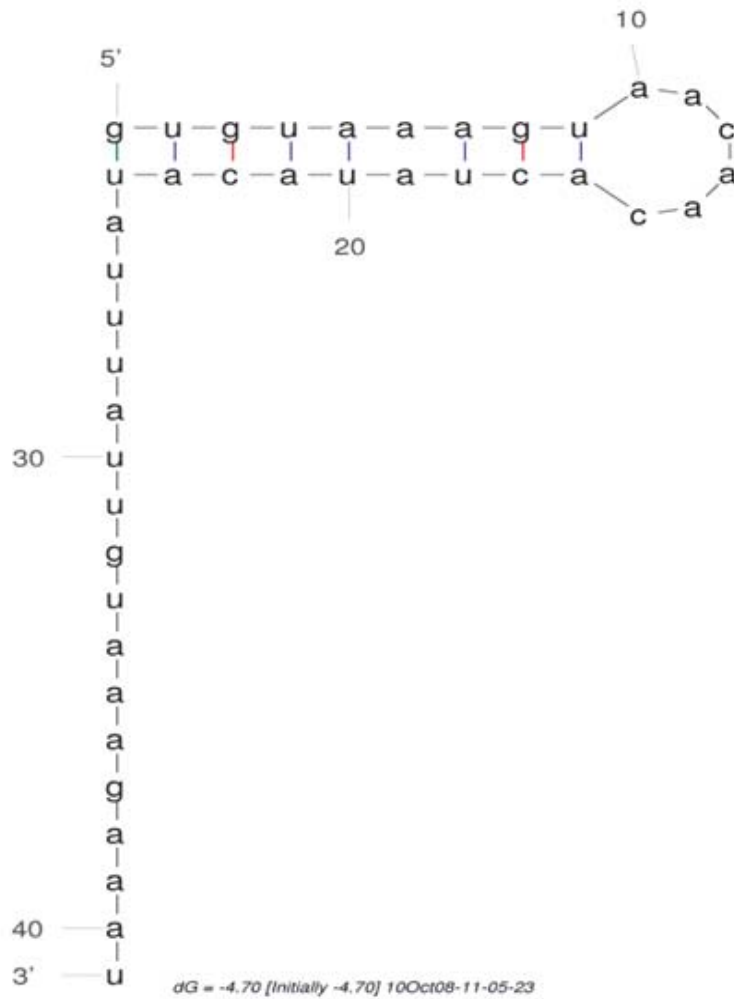


Figura III-14 Estrutura “hairpin” presente a montante do codão STOP do gene *CCCI*. Esta estrutura foi obtida com recurso à ferramenta bioinformática MFOLD (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>) (Zuker, 2003; Reeder *et al.*, 2006).

Capítulo IV

Conclusões e
Perspectivas

Neste trabalho, propusemo-nos pesquisar a relevância do factor de transcrição Yap5 em células de leveduras expostas a elevadas concentrações de ferro. Os resultados aqui apresentados e discutidos, permitiram-nos concluir e sugerir como trabalho futuro o seguinte:

(i) O Yap5 sendo um factor constitutivamente nuclear, apresenta uma regulação da sua actividade diferente dos outros membros, também nucleares, da família Yap (Yap4 e Yap6). Após a incubação com grandes quantidades de sulfato de ferro, embora o seu potencial de transactivação aumente (figura III-4), os níveis da proteína diminuem (figura III-1 e III-2), sendo essa diminuição mais drástica, com o aumento da intensidade do stress provocado pelo excesso de ferro (figura III-3). Esta diminuição da expressão poderá ser a forma que a célula possui de modular a actividade deste factor.

De forma a averiguar se a regulação do Yap5 é ao nível transcricional ou pós transcricional, a expressão do gene deverá ser estudada por PCR em tempo real, uma vez que não nos foi possível detectar a sua expressão por northern blot. Também seria interessante avaliar o potencial de transactivação deste factor na presença de ferro em intervalos de tempo curtos de modo a poder correlacionar com os níveis de proteína.

(ii) Ao contrário do mutante *ccc1*, o crescimento do mutante *yap5* em meio com excesso de sulfato de ferro é apenas ligeiramente comprometido (figura III-5). No entanto, o Yap5 regula efectivamente a expressão do gene *CCCI* (figura III-6).

(iii) Os níveis basais de *CCCI* parecem ser suficientes para que a célula cresça em condições de altas concentrações de ferro (figura III-8). Dever-se-á avaliar os níveis de proteína Ccc1 por western blot.

(iv) Ao contrário do que acontece em *S.pombe*, o factor de transcrição Hap4 parece não estar envolvido na regulação da expressão do gene *CCCI* (figuras III-9 e III-10).

(v) Delecções sequenciais da região promotora do gene *CCCI* revelaram que uma região de 58pb a montante do ATG é suficiente para conferir ao mutante *cccI* a capacidade de crescer em meio com excesso de ferro (figura III-13).

(vi) A região 3'UTR do gene *CCCI* é importante na regulação do gene (figura III-13). Nesta região existe uma estrutura em forma de “hairpin” (figura III-14) que poderá estar envolvida nessa regulação. Assim, futuramente será importante determinar o fim da região 3' do gene *CCCI* através de ensaios de RACE (“Rapid Amplification of cDNA Ends”), remover por PCR de fusão a estrutura em “hairpin” e monitorizar o crescimento do mutante *cccI* transformado com a construção resultante. Como a remoção da região 3'UTR do gene *CCCI*, embora comprometa, não inviabiliza o crescimento em meio com elevadas concentrações de sulfato de ferro (figura III-13), será necessário testar se na regulação da expressão do gene são importantes tanto a região 3'UTR como a 5' reguladora.

Face a estes dados, emerge uma questão: qual a relevância do Yap5 no excesso de ferro? É facto que este factor em condições de excesso de ferro regula o *CCCI* e que o seu potencial de transactivação aumenta na presença de ferro (figuras III-4 e III-7, respectivamente). No entanto o crescimento da estirpe *yap5* não revela um forte fenótipo de sensibilidade ao excesso de ferro (figura III-5) e construções sem os YAP sites, quando introduzidas no mutante *cccI*, revertem o fenótipo de sensibilidade desta estirpe (figuras III-8 e III-12). Assim, parece-nos plausível sugerir que o Yap5 poderá desempenhar um papel crucial na sobrevivência celular em situações de excesso de ferro, no caso de falha dos factores responsáveis pela expressão basal do gene *CCCI*. Se esta hipótese for válida, então uma construção do gene *CCCI* com os YAP sites mas sem a região 3'UTR (*CCCI_fp_stop*) deverá apresentar um crescimento mais robusto na presença de ferro do que a construção sem os YAP sites e sem a região 3'UTR (*CCCI_sp_stop*). Por outro lado, o duplo mutante *yap5cccI* transformado com *CCCI_fp_stop* deverá ser mais sensível ao excesso de ferro que a estirpe *cccI* transformada com a mesma construção.

Referências Bibliográficas

- AUSUBEL, F. M., F. KATAGIRI, M. MINDRINOS AND J. GLAZEBROOK (1995). "Use of *Arabidopsis thaliana* defense-related mutants to dissect the plant response to pathogens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4189-4196.
- COLEMAN, S. T., E. TSENG AND W. S. MOYE-ROWLEY (1997). "*Saccharomyces cerevisiae* basic region-leucine zipper protein regulatory networks converge at the ATR1 structural gene." *J Biol Chem* **272**(37): 23224-23230.
- DALLMAN, P. R. (1986). "Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency." *Annu Rev Nutr* **6**: 13-40.
- DUNN, L. L., Y. S. RAHMANTO AND D. R. RICHARDSON (2007). "Iron uptake and metabolism in the new millennium." *Trends Cell Biol* **17**(2): 93-100.
- EISENSTEIN, R. S. AND K. L. ROSS (2003). "Novel roles for iron regulatory proteins in the adaptive response to iron deficiency." *J Nutr* **133**(5 Suppl 1): 1510S-1516S.
- FERNANDES, L., C. RODRIGUES-POUSADA AND K. STRUHL (1997). "Yap, a Novel Family of Eight bZIP Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with Distinct Biological Functions." *Mol. Cell. Biol.* **17**(12): 6982-6993.
- FORSBURG, S. L. AND L. GUARENTE (1989). "Identification and characterization of *HAP4*: a third component of the CCAAT-bound *HAP2/HAP3* heteromer." *Genes Dev* **3**(8): 1166-1178.
- GASCH, A. P. AND M. WERNER-WASHBURNE (2002). "The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation." *Funct Integr Genomics* **2**(4-5): 181-192.
- GIETZ, R. D. AND R. H. SCHIESTL (1991). "Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier." *Yeast* **7**(3): 253-263.
- GOFORTH, J. B., S. A. ANDERSON, C. P. NIZZI AND R. S. EISENSTEIN (2010). "Multiple determinants within iron-responsive elements dictate iron regulatory protein binding and regulatory hierarchy." *RNA* **16**(1): 154-169.
- HALLIWELL, B. AND J. M. GUTTERIDGE (1992). "Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update." *FEBS Lett* **307**(1): 108-112.
- HARBISON, C. T., D. B. GORDON, T. I. LEE, N. J. RINALDI, K. D. MACISAAC, T. W. DANFORD, N. M. HANNETT, J. B. TAGNE, D. B. REYNOLDS, J. YOO, E. G. JENNINGS, J. ZEITLINGER, D. K. POKHOLOK, M. KELLIS, P. A. ROLFE, K. T. TAKUSAGAWA, E. S. LANDER, D. K. GIFFORD, E. FRAENKEL AND R. A. YOUNG (2004). "Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome." *Nature* **431**(7004): 99-104.
- HENTZE, M. W. AND L. C. KUHN (1996). "Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8175-8182.
- HENTZE, M. W., M. U. MUCKENTHALER AND N. C. ANDREWS (2004). "Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism." *Cell* **117**(3): 285-297.

- HERRERO, E., J. ROS, G. BELLÍ AND E. CABISCOL (2008). "Redox control and oxidative stress in yeast cells." *Biochim Biophys Acta* **1780**(11): 1217-1235.
- HETTEMA, E. H., C. W. VAN ROERMUND, B. DISTEL, M. VAN DEN BERG, C. VILELA, C. RODRIGUES-POUSADA, R. J. WANDERS AND H. F. TABAK (1996). "The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*." *EMBO J* **15**(15): 3813-3822.
- ILINA, Y., E. SLOMA, E. MACIASZCZYK-DZIUBINSKA, M. NOVOTNY, M. THORSEN, R. WYSOCKI AND M. J. TAMAS (2008). "Characterization of the DNA-binding motif of the arsenic-responsive transcription factor Yap8p." *Biochem J* **415**(3): 467-475.
- KAPLAN, C. D. AND J. KAPLAN (2009). "Iron acquisition and transcriptional regulation." *Chem Rev* **109**(10): 4536-4552.
- KHURANA, V. AND S. LINDQUIST (2010). "Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast?" *Nat Rev Neurosci* **11**(6): 436-449.
- LEE, T. I., N. J. RINALDI, F. ROBERT, D. T. ODOM, Z. BAR-JOSEPH, G. K. GERBER, N. M. HANNETT, C. T. HARBISON, C. M. THOMPSON, I. SIMON, J. ZEITLINGER, E. G. JENNINGS, H. L. MURRAY, D. B. GORDON, B. REN, J. J. WYRICK, J. B. TAGNE, T. L. VOLKERT, E. FRAENKEL, D. K. GIFFORD AND R. A. YOUNG (2002). "Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*." *Science* **298**(5594): 799-804.
- LEIPUVIENE, R. AND E. C. THEIL (2007). "The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron and oxygen." *Cell Mol Life Sci* **64**(22): 2945-2955.
- LI, H., D. T. MAPOLELO, N. N. DINGRA, S. G. NAIK, N. S. LEES, B. M. HOFFMAN, P. J. RIGGS-GELASCO, B. H. HUYNH, M. K. JOHNSON AND C. E. OUTTEN (2009). "The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation." *Biochemistry* **48**(40): 9569-9581.
- LI, L., D. BAGLEY, D. M. WARD AND J. KAPLAN (2008). "Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast." *Mol Cell Biol* **28**(4): 1326-1337.
- LI, L., O. S. CHEN, D. MCVEY WARD AND J. KAPLAN (2001). "CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast." *J Biol Chem* **276**(31): 29515-29519.
- LI, Z. S., Y. P. LU, R. G. ZHEN, M. SZCZYPKA, D. J. THIELE AND P. A. REA (1997). "A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(1): 42-47.
- LI, Z. S., M. SZCZYPKA, Y. P. LU, D. J. THIELE AND P. A. REA (1996). "The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump." *J Biol Chem* **271**(11): 6509-6517.
- MEDICINE, I. O. (2001). "Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc." *Washington, DC: National Academy Press*.
- MENEZES, R. A., C. AMARAL, L. BATISTA-NASCIMENTO, C. SANTOS, R. B. FERREIRA, F. DEVAUX, E. C. ELEUTHERIO AND C. RODRIGUES-POUSADA (2008). "Contribution of Yap1 towards *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to arsenic-mediated oxidative stress." *Biochem J* **414**(2): 301-311.

- MERCIER, A. AND S. LABBE (2009). "Both Php4 function and subcellular localization are regulated by iron via a multistep mechanism involving the glutaredoxin Grx4 and the exportin Crm1." *J Biol Chem* **284**(30): 20249-20262.
- MERCIER, A., B. PELLETIER AND S. LABBE (2006). "A transcription factor cascade involving Fep1 and the CCAAT-binding factor Php4 regulates gene expression in response to iron deficiency in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Eukaryot Cell* **5**(11): 1866-1881.
- MOCKLI, N. AND D. AUERBACH (2004). "Quantitative beta-galactosidase assay suitable for high-throughput applications in the yeast two-hybrid system." *Biotechniques* **36**(5): 872-876.
- MONTEIRO, P. T., N. D. MENDES, M. C. TEIXEIRA, S. D'OREY, S. TENREIRO, N. P. MIRA, H. PAIS, A. P. FRANCISCO, A. M. CARVALHO, A. B. LOURENCO, I. SA-CORREIA, A. L. OLIVEIRA AND A. T. FREITAS (2008). "YEAstract-DISCOVERER: new tools to improve the analysis of transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic Acids Res* **36**(Database issue): D132-136.
- NEVITT, T., J. PEREIRA AND C. RODRIGUES-POUSADA (2004). "YAP4 gene expression is induced in response to several forms of stress in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **21**.
- OJEDA, L., G. KELLER, U. MUHLENHOFF, J. C. RUTHERFORD, R. LILL AND D. R. WINGE (2006). "Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **281**(26): 17661-17669.
- PHILPOTT, C. C. AND O. PROTCHENKO (2008). "Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Eukaryot Cell* **7**(1): 20-27.
- PUIG, S., E. ASKELAND AND D. J. THIELE (2005). "Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation." *Cell* **120**(1): 99-110.
- PUJOL-CARRION, N., G. BELLÍ, E. HERRERO, A. NOGUES AND M. A. DE LA TORRE-RUIZ (2006). "Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Sci* **119**(Pt 21): 4554-4564.
- REEDER, J., M. HOCHSMANN, M. REHMSMEIER, B. VOSS AND R. GIEGERICH (2006). "Beyond Mfold: recent advances in RNA bioinformatics." *J Biotechnol* **124**(1): 41-55.
- RODRIGUES-POUSADA, C., R. A. MENEZES AND C. PIMENTEL (2010). "The Yap family and its role in stress response." *Yeast* **27**(5): 245-258.
- RODRIGUES-POUSADA, C., T. NEVITT AND R. MENEZES (2005). "The yeast stress response. Role of the Yap family of b-ZIP transcription factors. The PABMB Lecture delivered on 30 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw." *Febs J* **272**(11): 2639-2647.
- RODRIGUES-POUSADA, C. A., T. NEVITT, R. MENEZES, D. AZEVEDO, J. PEREIRA AND C. AMARAL (2004). "Yeast activator proteins and stress response: an overview." *FEBS Lett.* **567**: 80-85.
- ROUAULT, T. A. (2003). "How mammals acquire and distribute iron needed for oxygen-based metabolism." *PLoS Biol* **1**(3): E79.
- TAN, K., H. FEIZI, C. LUO, S. H. FAN, T. RAVASI AND T. G. IDEKER (2008). "A systems approach to delineate functions of paralogous transcription factors: role of the Yap family in the DNA damage response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8): 2934-2939.

- TEIXEIRA, M. C., P. MONTEIRO, P. JAIN, S. TENREIRO, A. R. FERNANDES, N. P. MIRA, M. ALENQUER, A. T. FREITAS, A. L. OLIVEIRA AND I. SA-CORREIA (2006). "The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D446-451.
- TOONE, W. M. AND N. JONES (1999). "AP-1 transcription factors in yeast." *Curr Opin Genet Dev* **9**(1): 55-61.
- WORKMAN, C. T., H. C. MAK, S. MCCUINE, J. B. TAGNE, M. AGARWAL, O. OZIER, T. J. BEGLEY, L. D. SAMSON AND T. IDEKER (2006). "A systems approach to mapping DNA damage response pathways." *Science* **312**(5776): 1054-1059.
- YAMAGUCHI-IWAI, Y., A. DANCIS AND R. D. KLAUSNER (1995). "AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo J* **14**(6): 1231-1239.
- YAMAGUCHI-IWAI, Y., R. STEARMAN, A. DANCIS AND R. D. KLAUSNER (1996). "Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast." *EMBO J* **15**(13): 3377-3384.
- YAMAGUCHI-IWAI, Y., R. UETA, A. FUKUNAKA AND R. SASAKI (2002). "Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **277**(21): 18914-18918.
- ZUKER, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3406-3415.